

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591449

研究課題名(和文) 関節リウマチにおける自己抗体産生誘導T細胞の解析

研究課題名(英文) Investigating T cells helping autoantibody production in rheumatoid arthritis

研究代表者

山田 久方 (Yamada, Hisakata)

九州大学・生体防御医学研究所・准教授

研究者番号：20363369

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は関節リウマチに関連した自己抗体産生における、抗体産生誘導T細胞やこれらが産生するIL-21の機能を検討した。IL-21受容体欠損マウスを用いた研究から、IL-21は抗体産生誘導T細胞自体の分化には必要ないが、それによる自己抗体産生の誘導には必須であり、そのためこれらのマウスは関節炎誘導に抵抗性であることが判明した。ヒト患者検体の解析では、末梢血中の抗体産生誘導T細胞と疾患活動性や自己抗体価に明らかな相関は認めなかったが、関節内には典型的な抗体産生誘導T細胞とは異なる表現型のIL-21産生細胞を多く認め、局所での抗体産生や異所性リンパ濾胞形成への関与が考えられた。

研究成果の概要(英文)：We examined in this study the functions of follicular helper T cells, which induce antibody production by B cells by producing IL-21, in the autoantibody production in rheumatoid arthritis. We found that mice deficient for IL-21 receptor were resistant for the development of experimental arthritis, despite normal induction of follicular helper T cells, due to defective autoantibody production by B cells. In the patient samples, the number of follicular helper T cells in the peripheral blood did not correlate with the disease activity or autoantibody levels. However, IL-21-producing T cells not showing typical phenotypes of follicular helper T cells were abundant in the joint, suggesting their involvement in local autoantibody production and ectopic germinal center formation.

研究分野：臨床免疫学

キーワード：関節リウマチ ヘルパーT細胞 自己抗体 実験的関節炎

### 1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ (RA) の原因は、何らかの自己抗原に対する自己免疫反応であり、MHC クラス II との強い遺伝子相関などから、CD4T 細胞が、中心的な役割を果たしていると考えられている。一方、RA に最も特異性の高い免疫異常として、抗シトルリン化タンパク抗体の存在が知られており、RA の病因に深く関わると想定されるが、これが産生される分子機構は現在のところ不明である。

ここで CD4T 細胞の重要な機能の一つに、B 細胞の抗体産生誘導が挙げられる。近年、リンパ濾胞内で抗体のアイソタイプスイッチや親和性成熟を誘導する、独立したヘルパー CD4T 細胞サブセットとして、濾胞ヘルパー T 細胞 (Follicular helper T cell: Tfh) がマウスおよびヒトで同定された。Tfh 細胞は機能的にはサイトカインの一つである IL-21 の産生をその特徴とし、これを介して B 細胞に作用する。しかし IL-21 の受容体は B 細胞以外の細胞も発現しており、そのため生体内では様々な作用を持つことが示されていた。

研究開始時点において、ヒト RA、およびマウス関節炎モデルで、Tfh 細胞やこれらが産生する IL-21 が、関節炎病態や、それに関連する自己抗体産生において、どのような機能を果たしているかは不明であった。

### 2. 研究の目的

本研究ではまず IL-21 レセプター欠損マウスを用いた関節炎動物実験で、関節炎病態と自己抗体産生において、Tfh 細胞の産生する IL-21 の役割を検討した。関節炎のモデルには II 型コラーゲン (CII) で免疫することで誘導する、コラーゲン誘導性関節炎 (collagen-induced arthritis: CIA) を用いた。また、これと並行して RA 患者の末梢血、関節液、さらに関節滑膜組織中で Tfh 様細胞を同定し、それらの機能的特徴を明らかにする。さらにそれらと病態との関連についての解析を試みる。これらの解析から、関節炎病態やそれに関連する自己抗体産生における、Tfh や IL-21 の役割を明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) IL-21 受容体欠損マウスにおける CIA の誘導と解析

動物実験：九州大学医学部動物実験倫理委員会および九州大学遺伝子組み換え実験安全委員会の承認を受けて行なわれた。

マウス：IL-21 受容体欠損マウス (C57BL/6 背景) は、米国 NIH、Warren Leonard 博士より供与を受けた。

CIA 誘導と評価：ニワトリ由来 CII を、CFA と共に免疫、3 週間後に追加免疫を行なった。追加免疫後は隔日で関節炎発症を肉眼的に評価。免疫後 60 日では組織学的評価も行った。

免疫学的解析：CIA 誘導後、経時的に血清を採取、血清中の抗 CII 抗体価を ELISA 法に

て測定。免疫後 14 日、35 日ではリンパ節、脾臓を採取し、フローサイトメーター解析、T 細胞抗原反応性解析に供した。

(2) ヒト RA における抗体産生誘導性ヘルパー CD4T 細胞の機能解析

臨床検体：九州大学倫理審査委員会での承認の後、九州大学整形外科、国立病院機構九州医療センターリウマチ科、近藤リウマチ整形外科クリニックから文書にて同意を得た後に採取した。

フローサイトメーター解析：末梢血および関節液リンパ球は密度勾配遠心法にて、滑膜リンパ球はコラーゲンゼ処理にて採取した。リンパ球表面抗原 (CXCR5, PD-1, ICOS 等) を多重染色法にて解析した。サイトカイン産生は PMA と ionomycin で 4 時間刺激後に細胞内染色法によって検出した。

滑膜組織培養：新鮮滑膜組織片を培養プレートインサート上で培養した (気相液相界面培養)。経時的に組織学的解析、培養上清中の自己抗体およびサイトカイン濃度測定を行なった。

### 4. 研究成果

(1) IL-21 受容体欠損マウスにおける CIA の免疫病態解析

IL-21 受容体欠損マウスは CIA 誘導後、関節炎をほとんど発症せず、これは組織学的にも確認された。すなわち IL-21 シグナルは CIA 発症に必須であることが明らかになった。

関節炎抵抗性のメカニズムを調べるため、CIA 誘導後、経時的に血清抗 CII 抗体価を測定したところ、IL-21 受容体欠損マウスでも IgM クラスの抗体は、野生型と同レベルで産生されていた。一方、IgG 型抗 CII 抗体抗体価は著明に低下しており、CIA 発症が抗体依存性であることを鑑みると、これが関節炎抵抗性の主因と考えられた。

一方、T 細胞の機能について調べてみると、CII 特異的な IL-17 産生や IFN- $\gamma$  産生には IL-21 受容体欠損マウスと野生型マウスの間に差を認めなかった。

次に IL-21 受容体欠損マウスにおける IgG 型抗体産生の低下のメカニズムをフローサイトメーターを用いて解析したところ、濾胞胚中心 B 細胞の数が著減していたが、Tfh 細胞は減少していなかった。

上記の結果から B 細胞自身の IL-21 シグナルが CIA 発症に重要な可能性が考えられるため、IL-21 欠損マウスおよび野生型マウス由来の CD4T 細胞および B 細胞の、異なる組み合わせの移入実験を行なった。その結果 B 細胞が IL-21 欠損マウス由来のときにのみ CIA 発症が抑制されていたことから、上記仮説が証明された。これらの解析から CIA 発症を担う自己抗体産生における、IL-21 の役割が明らかになることが出来た。

(2) ヒト RA における抗体産生誘導性ヘルパー CD4T 細胞の機能解析

まず過去の報告に従い RA 患者末梢血中の

CXCR5 陽性循環 Tfh 細胞をフローサイトメータ法にて検出した。これらの一部は PD-1 分子も発現していた。しかし、これら Tfh 細胞の数と RA 疾患活動性や抗シトルリン抗体価の間に明らかな相関は認めなかった。

一方、関節内の CD4T 細胞についても調べたところ、末梢血にみられたような CXCR5 を発現する細胞は少数しか存在しなかったが、代わりに PD-1 のみを発現する細胞を数多く認めた。さらに IL-21 産生能を有する細胞も関節内には多く存在し、これらには PD-1 陽性、陰性いずれ群も含まれていた。

これらの細胞は関節内、特に滑膜で B 細胞の抗体産生誘導に働いている可能性が考えられたため、滑膜組織での抗体産生を検出する方法を開発した。最終的に気相液相界面培養法により、数週間にわたり滑膜組織を培養することも可能になった。しかし、滑膜組織検体数の減少なども重なったため、研究期間内にこの系を用いてのヘルパー T 細胞の役割を検討するまでには至らなかった。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 21 件)

Sakuraba K, Fujimura K, Nakashima Y, Okazaki K, Fukushi JI, Ohishi M, Oyamada A, Esaki Y, Miyahara H, Iwamoto Y, Yoshikai Y, Yamada H. Successful in vitro culture of synovial explants from rheumatoid arthritis at the air-liquid interface. *Arthritis Rheumatol*. 2015, 67(4):887-92、査読有、doi: 10.1002/art.39019

Shinoda K, Sun X, Oyamada A, Yamada H, Muta H, Podack ER, Kira J, Yoshikai Y. CD30 ligand is a new therapeutic target for central nervous system autoimmunity. *J Autoimmun*. 2015, 57:14-23、査読有、doi: 10.1016/j.jaut.2014.11.005.

Nakamura M, Shibata K, Hatano S, Sato T, Ohkawa Y, Yamada H, Ikuta K, Yoshikai Y. A Genome-Wide Analysis Identifies a Notch-RBP-J -IL-7R Axis That Controls IL-17-Producing T Cell Homeostasis in Mice. *J Immunol*. 2015, 194(1):243-51、査読有、doi: 10.4049/jimmunol.1401619.

Hashiguchi T, Oyamada A, Sakuraba K, Shimoda K, Nakayama KI, Iwamoto Y, Yoshikai Y, Yamada H. Tyk2-Dependent Bystander Activation of Conventional and Nonconventional Th1 Cell Subsets Contributes to Innate Host Defense against *Listeria monocytogenes*

*Infection*. *J Immunol*. 2014, 192(10):4739-47、査読有、doi: 10.4049/jimmunol.1303067.

Shibata K, Yamada H, Nakamura M, Hatano S, Katsuragi Y, Kominami R, Yoshikai Y. IFN- $\gamma$ -Producing and IL-17-Producing T Cells Differentiate at Distinct Developmental Stages in Murine Fetal Thymus. *J Immunol*. 2014, 192(5):2210-8、査読有、doi: 10.4049/jimmunol.1302145.

Fujimura K, Oyamada A, Iwamoto Y, Yoshikai Y, Yamada H. CD4 T cell-intrinsic IL-2 signaling differentially affects Th1 and Th17 development. *J Leukoc Biol*. 2013, 94(2):271-9、査読有、doi: 10.1189/jlb.1112581.

Yamada H, Shibata K, Sakuraba K, Fujimura K, Yoshikai Y. Positive selection of self antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cells by hematopoietic cells. *Eur J Immunol*. 2013, 43(8):2033-42、査読有、doi: 10.1002/eji.201242957.

Miyake Y, Toyonaga K, Mori D, Kakuta S, Hoshino Y, Oyamada A, Yamada H, Ono KI, Suyama M, Iwakura Y, Yoshikai Y, Yamasaki S. C-type lectin MCL is an FcR $\gamma$ -coupled receptor that mediates the adjuvant activity of mycobacterial cord factor. *Immunity*. 2013, 38(5):1050-62、査読有、doi: 10.1016/j.immuni.2013.03.010.

Sakuraba K, Shibata K, Iwamoto Y, Yoshikai Y, Yamada H. Naturally occurring PD-1<sup>+</sup> memory phenotype CD8 T Cells belong to nonconventional CD8 T cells and are cyclophosphamide-sensitive regulatory T cells. *J Immunol*. 2013, 190(4):1560-6、査読有、doi: 10.4049/jimmunol.1202464.

[学会発表](計 19 件)

Hisakata Yamada, Koji Sakuraba, Yasunobu Yoshikai Successful in vitro culture of synovial explants from rheumatoid arthritis at the air-liquid interface. 第 43 回日本免疫学会総会・学術集会、平成 26 年 12 月 10 日、京都市

櫻庭康司、藤村謙次郎、宮原寿明、江崎幸雄、岩本幸英、吉開泰信、山田久方、関節リウマチ滑膜組織培養法の開発、第 42 回日本臨床免疫学会総会、平成 26 年 9 月

27 日、東京都

Hisakata Yamada, Johan Backlund, Rikard Holmdahl, Yasunobu Yoshikai. CD4 T cell tolerance to self type II collagen depends on post-translational modification in the T cell epitope. 第 42 回日本免疫学会総会・学術集会、平成 25 年 12 月 12 日、千葉市

Tomomitsu Hashiguchi, Koji Sakuraba, Yasunobu Yoshikai, Hisakata Yamada Differential requirement of Tyk2 for development of different subsets of CD44<sup>high</sup> memory phenotype CD4 T cells with Th1 functions. 第 42 回日本免疫学会総会・学術集会、平成 25 年 12 月 11 日、千葉市

櫻庭康司、小山田亜希子、藤村謙次郎、橋口智光、岩本幸英、吉開泰信、山田久方 IL-21 シグナルはコラーゲン誘導関節炎の発症に重要な役割を果たす、第 57 回日本リウマチ学会総会・学術集会、平成 25 年 4 月 18 日、京都市

Hisakata Yamada, Koji Sakuraba, Akiko Oyamada, Risa Nakamura, Kenjiro Fujimura, Yasunobu Yoshikai. IL-21 plays critical roles in the production of pathogenic autoantibody in a murine model of autoimmune arthritis. 第 41 回日本免疫学会総会・学術集会、平成 24 年 12 月 5 日、神戸市

Risa Nakamura, Yinxia Huang, Yojiro Arimori, Naoya Ohara, Hisakata Yamada, Yasunobu Yoshikai. IL-21 plays an important role in host defence against chronic bacterial infection. 第 41 回日本免疫学会総会・学術集会、平成 24 年 12 月 6 日、神戸市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山田 久方 (YAMADA, Hisakata)  
九州大学・生体防御医学研究所・准教授  
研究者番号：20363369

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：